

На правах рукописи



ЛИСОВСКАЯ Светлана Анатольевна

**НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА
КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *CANDIDA ALBICANS***

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2008

Работа выполнена в лаборатории микологии ФГУН Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Фассахов Рустем Салахович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор, зав.
каф. микробиологии КГМА. О.К. Поздеев,

доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры микробиологии КГУ
Т.В. Багаева

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение
науки Нижегородский научно-
исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени академика И. Н.
Блохиной Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится «13» ноября 2008 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском государственном университете.

Автореферат разослан « » 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

З. И. Абрамова

Актуальность проблемы. В последнее время неуклонно увеличивается заболеваемость кандидозом, при этом наиболее частым возбудителем остается *Candida albicans* [Елинов, 2007, Chaffin *et al.*, 1998]. Показано наличие штаммов, обладающих выраженными дерматонекротическими, адгезивными и гемолитическими свойствами, и отличающихся по ряду биологических свойств от штаммов, выделенных от здоровых лиц. В то же время даже среди штаммов-комменсалов могут встречаться штаммы, способные, под воздействием определенных экзогенных или эндогенных факторов, вызывать широкий спектр поражений.

На практике потенциальную патогенность принято характеризовать наличием и проявлением факторов патогенности, основанных на физиологических особенностях грибковой клетки и характере ее взаимодействия с макроорганизмом, которые способствуют закреплению гриба в организме и развитию заболевания [Дьяков с соавт., 2005]. Многие современные тесты (начиная с «феномена ростовых трубочек», определения активности ферментов и, наконец, ПЦР), лишь идентифицируют *C. albicans*. Наиболее распространенным лабораторным критерием тяжести течения кандидоза является определение величины титров маннанового антигена клеточной стенки *C. albicans*, проявляющего выраженную сенсибилизирующую активность [Сергеев с соавт., 2001, Глушко с соавт., 2002]. Однако, на сегодняшний день не выработано четких лабораторных критериев, позволяющих однозначно охарактеризовать патогенность штамма и разграничить кандидоз и кандиданосительство. Экспериментальное заражение животных для определения патогенности *C. albicans* в практических лабораториях не используется.

В связи с этим важным дополнением к установлению патогенности штамма является изучение взаимосвязи основных факторов патогенности грибов (адгезии, уровня антигенов) у различных клинических штаммов *C. albicans* с целью выяснения их соотношения при различных проявлениях кандидоза. В этом плане использование комплексного подхода может способствовать разработке единого лабораторного теста для определения уровня патогенности штамма *C. albicans*.

Известно, что любой инфекционный процесс начинается с адгезии возбудителя на клетках-мишенях. Все *C. albicans* обладают выраженной способностью прикрепляться к органическим и неорганическим субстратам. В настоящее время стало возможным измерять степень адгезии. Установлена четкая корреляция между способностью гриба к адгезии и его вирулентностью в эксперименте [Сергеев с соавт., 2001].

Таким образом, поскольку адгезия гриба к клеткам и тканям макроорганизма является первоначальной ступенью инвазии грибковых клеток и одним из основных факторов патогенности, приводящей к развитию кандидоза, было бы чрезвычайно интересно изучить адгезивные свойства клинических штаммов с целью выяснения их связи с особенностями проявления заболевания.

В этом плане представляет интерес разработка легко воспроизводимого метода определения адгезивной активности штаммов. Существующие в настоящее время модели адгезии из-за разнообразия условий существования штаммов, приводящей к выборочной экспрессии различных механизмов адгезии не являются абсолютно адекватными и удобными для исследования большого количества штаммов [Сергеев с соавт., 2001].

Цель и задачи исследования. Целью представляемой работы является изучение основных факторов патогенности (адгезии и уровня антигенов) у различных клинических штаммов *C. albicans in vitro* с целью выяснения их соотношения при различных проявлениях кандидоза. Достижение поставленной цели связывалась с решением следующих задач:

1. Разработать новую модель для определения адгезивных свойств дрожжеподобных грибов.
2. Исследовать адгезивные свойства штаммов, выделенных от больных с различными формами кандидозов.
3. Изучить и сопоставить основные факторы патогенности (адгезии и уровня антигенов) с учетом конкретной локализации грибов.
4. Оценить влияние грибов-ассоциантов на степень проявления адгезивных свойств гриба.

Научная новизна работы. Разработана модель адгезии клеток *C. albicans* на нитроцеллюлозную пленку с иммобилизованным гемоглобином, которая адекватно отражает уровень адгезии штаммов и позволяет в полной мере раскрыть их адгезивные свойства. Используемая пленка имеет постоянные свойства, что позволяет проводить исследование большого количества штаммов в идентичных условиях, тем самым, делая возможной стандартизацию предлагаемого метода определения адгезивных свойств.

Впервые проведено сопоставление двух основных факторов патогенности (адгезии и уровня антигенов) грибов *C. albicans in vitro* на различных клинических штаммах, включая и музейный штамм. Исследования показали отличия в биологических и биохимических свойствах штаммов, в том числе, в зависимости от их мест локализации в макроорганизме. Выявлена корреляция между различными характеристиками вирулентных свойств гриба. Штаммы с высоким процентом адгезии содержали большое количество антигена в клетках.

Изучено влияние условий культивирования штаммов на проявление факторов патогенности. Подобраны оптимальные условия (состав среды культивирования, температура, рН среды инкубации и т.д.) для проведения эксперимента *in vitro*, наиболее приближенные к жизнедеятельности грибов в макроорганизме. Показано изменение процесса адгезии под влиянием экстракта из грибов, которые наиболее часто обнаруживаются в ассоциациях с *C. albicans*.

Практическая ценность работы. Предложена модель для определения уровня адгезии штаммов дрожжеподобных грибов, которая может быть применима в практикующих лабораториях. Эту модель характеризуют постоянные свойства носителя, что позволяет определять адгезивные свойства большого количества штаммов в идентичных условиях, тем самым, делая возможной стандартизацию метода.

Использование предлагаемой модели помогает быстро дифференцировать патогенные и непатогенные штаммы по проявляемому ими уровню адгезии к белкам (в частности, гемоглобину).

Использование комплексного подхода к изучению патогенных свойств штамма (адгезивной способности и антигенных свойств), позволит систематизировать штаммы по их способности быстро колонизировать, инфицировать, и «избегать» защитные механизмы макроорганизма.

Результаты исследования могут быть использованы как один из критериев диагностики кандидоза и прогнозирования микотических осложнений у больных с иммунодефицитами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработана эффективная модель *in vitro* для определения адгезивных свойств дрожжеподобных грибов, где в качестве субстрата адгезии предложен гемоглобин.
2. У музейных и клинических штаммов *C. albicans* выделенных от больных с различными формами кандидоза выявлены значительные различия в адгезивных свойствах.
3. Адгезия и антигенная активность клинических штаммов *C. albicans* коррелирует между собой.
4. Разработан и рекомендуется к применению новый способ оценки патогенного потенциала клинических штаммов *C. albicans*.

Апробация работы.

Результаты работы докладывались и обсуждались на научно-практической конференции «Актуальные проблемы дерматовенерологии. XXI век» (Казань, 2003), Научно-практической конференции по медицинской микологии (VIII Кашкинские чтения, С.-Петербург, 2005г.), IX Всероссийском Съезде дерматовенерологов (Москва, 2005г.), IV Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2006г.), IX Кашкинских чтениях (С.-Петербург, 2006г.), V Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2007г.), X Кашкинских чтениях (С.-Петербург, 2007г.), XVII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Казань, 2007г.), II Съезде микологов России (Москва, 2008г.).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 17 работ. Из них 4 статьи и 13 тезисов докладов на всероссийских конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц и 21 рисунков. Работа состоит из

введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 164 источника (в том числе 130 иностранных автора).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований. В качестве объектов исследований использовали штаммы *C. albicans*. Непатогенный музейный штамм №4 *C. albicans*, полученный из коллекции музея ЦКВИ (г. Москва) и используемый на производстве при получении антигенных препаратов – как отрицательный контроль и штамм № 228 *C. albicans*, выделенный от больной с клинически подтвержденным диагнозом (системный кандидоз кожи и слизистой) (г. Казань) - как положительный контроль (табл. 1). Также использованы, штаммы *C. albicans*, выделенные в микологической лаборатории КНИИЭМ, от пациентов в возрасте от 1 до 56 лет, находящихся на амбулаторном лечении, с клиническими признаками поверхностной кандидозной инфекции различной локализации (слизистых и кожных покровов). При отборе в группу клинически значимых штаммов учитывались клинические проявления заболевания и выявление *C. albicans* в количестве, превышающем 10^3 КОЕ/мл. Группу клинически незначимых составили штаммы от пациентов без клинических признаков кандидоза, у которых выявлено менее 10^2 КОЕ/мл *C. albicans*. Всего протестировано 457 штаммов *C. albicans*.

Таблица 1.

Характеристика тест-штаммов *C. albicans*.

Штамм	Место выделения	Время достижения экспоненциального роста, часы	Образование ростковых трубок, %	Чувствительность к антимикотикам
№ 4	Музейный	60	3%	Чувствителен
№228	Слизистая ротовой полости	48	42%	* Слабо чувствителен

*Штамм устойчив к флуканазолу, полиеновым антибиотикам (нистатин, амфотерицин), клотримазолу, кетоканазолу. Чувствителен к тербинафину и итраконазолу.

Определение видовой принадлежности штаммов

Выделение и посев материала, количественный учет клеток *C. albicans*

Штаммы грибов *C. albicans* выделялись от больных и условно здоровых лиц в зависимости от локализации микоза с помощью стерильного тампона из гигроскопической ваты с последующим смывом дистиллированной водой. Затем тампон помещали в стерильную пробирку с 2 мл дистиллированной воды [Аравийский с соавт., 2004].

Посев проводился на агаризованную среду Сабуро в две чашки Петри, причем в одну чашку добавлялся стрептомицин в количестве 70 ед/мл среды.

Засеянные среды выдерживали в термостате при температуре 30⁰С в течение 48-72 часа. Производили расчет численности клеток *C. albicans* в смыве с 1 тампона в 1 мл дистиллированной воды

Идентификация грибов *C. albicans* Применение специальных методик идентификации проводили после того, как на среде Сабуро получали колонии, отвечающие макро- и микроморфологическим признакам дрожжеподобных грибов *C. albicans*.

Идентификацию грибов *C. albicans* проводили в соответствии с рекомендациями по «Диагностике микозов» [2004]. Проростковая проба, или тест на образование герминативных (проростковых, или зародышевых) трубок, тест ассимиляции углеводов, тест ферментации углеводов, выявление хламидоспор. Также, для идентификации использовалась коммерческая комбинированная тест-система «Auxacolor», выпускаемая фирмой BioRad.

Определение уровня адгезии штаммов *C. albicans*

Приготовление нитроцеллюлозной пленки

0.05 г нитроцеллюлозы растворяли при помощи магнитной мешалки 30-40 минут с добавлением 1.25 мл бутилацетата, 0.750 мл толуола и 0.06 мл глутарового альдегида. Через 3 минуты добавляли 1-3 капли гексана и снова перемешивали. Полученный раствор разливали в чашку Петри (d=10) и сушили под вентилятором. Через 15 минут в эту чашку Петри наливали дистиллированную воду и всплывшую пленку высушивали до воздушно-сухого состояния на фильтровальной бумаге [Медянцева с соавт., 1999].

Иммобилизация белков на нитроцеллюлозную пленку

1 вариант: 0.05 г белка разводили в 5 мл фосфатного буферного раствора с рН 7 и добавляли к растворенной нитроцеллюлозе и перемешивали при помощи магнитной мешалки. Затем добавляли 0.06 мл глутарового альдегида, 1-3 капли гексана и 3 минуты перемешивали. Полученный раствор разливали в чашку Петри (d=10) и сушили под вентилятором. Через 15 минут в эту чашку Петри наливали дистиллированную воду и всплывшую пленку высушивали до воздушно-сухого состояния на фильтровальной бумаге.

2 вариант: 0.05 г белка разводили в 5 мл фосфатного буферного раствора с рН 7. Нитроцеллюлозную пленку помещали в растворенный белок и инкубировали 2 часа при температуре 20⁰С. Пленку высушивали при комнатной температуре на фильтровальной бумаге [Медянцева с соавт., 1999].

Приготовление суспензии клеток *C. albicans*.

Исследования проводились на дрожжевых клетках *C. albicans*. После выделения гриба в чистую культуру готовили их суспензию. Для этого штаммы гриба выращивали в пробирках на скошенной среде Сабуро, в течение 48 часов при температуре 30⁰С. Для получения суспензии из колонии микробиологической петлей осторожно снимали слой клеток, при этом петля должна легко скользить во избежание повреждения клеточных стенок. Затем клетки грибов суспендировали в 3 мл фосфатного буферного раствора с рН 5.

Определение количества адгезировавшихся клеток

После приготовления пленки приступали непосредственно к определению уровня адгезии. Вначале измеряли оптическую плотность приготовленной суспензии клеток при длине волны 540 нм. Раствором сравнения служил фосфатный буфер. После измерения оптической плотности в пробирку с 3 мл суспензии клеток помещали нитроцеллюлозную пленку площадью 7 см² и инкубировали 2 часа при температуре 30⁰С. Затем, встряхнув несколько раз пробирку, для получения однородной взвеси клеток, снова измеряли оптическую плотность суспензии клеток при длине волны 540 нм. Количество адгезировавшихся клеток на нитроцеллюлозную пленку определяли по разнице начальной и конечной оптической плотности суспензии клеток и подсчетом клеток адгезировавшихся на поверхности пленки не менее 10 полей при помощи микроскопа Микмед-6 увеличение 10х20.

Влияние трипсина и маннопротеидного антигена клеточной стенки *C. albicans* на адгезию клеток *C. albicans*.

Влияния трипсина и маннопротеидного антигена клеточной стенки *C. albicans* проводили методом острого опыта [Дудка с соавт., 1982].

В 5 мл раствора трипсина (0.025 г трипсина растворяли в 5 мл дистиллированной воды) суспендировали клетки *C. albicans* и инкубировали 1 час при температуре 30⁰С. Затем биомассу отделяли от трипсина на центрифуге в течение 10 минут, при 3000 g. Клетки гриба дважды отмывали от раствора трипсина 2-кратным объемом дистиллированной воды. Клетки грибов суспендировали в 3 мл фосфатного буферного раствора с рН 5. После этого проводили определение адгезивных свойств как описано выше.

Для изучения влияния маннопротеидного антигена клеточной стенки *C. albicans* на процесс адгезии к 1.5 мл раствора антигена (0.5 мг антигена растворяли в дистиллированной воде) добавляли 3.5 мл фосфатного буферного раствора с рН 5, куда затем помещали нитроцеллюлозную пленку с иммобилизованным белком. Инкубировали 1 час при температуре 30⁰С. Определение адгезии проводили, как описано выше.

Определение содержания количества антигена клетками *C. albicans*.

Получение антигенов

Для получения антигена *C. albicans* использовали методику получения антигенов по ВФС 42-93-88 [Глушко с соавт., 1986], разработанную в лаборатории по разработке грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии.

В колбы с жидкой питательной средой (200 мл), где присутствует экзогенный белок (БСА), как единственный источник азота, засеивали штаммы *C. albicans*. Процесс выращивания проходил при рН 5.5, в течение 6 суток, температура культивирования +30⁰С. По окончании культивирования измерялась оптическая плотность при длине волны 540 нм. Чистоту культуры контролировали микроскопированием нативных препаратов. Затем питательную среду вместе с культурой клеток центрифугировали (3000gx10мин) в течение 10 минут. Осадок, состоящий из клеток *C. albicans*

высушивали и взвешивали. Затем клетки гриба помещали в стерильную ступку и растирали стерильным песком. После измельчения клеток в ступку добавили 5 мл стерильной дистиллированной воды, полученную кашу перенесли в центрифужные пробирки и центрифугировали ($3000g \times 10 \text{ мин}$) в течение 10 мин. В надосадочной жидкости измеряли количество антигена содержащегося в клетках гриба. Расчет количества антигена производили по отношению к оптической плотности культуры. Все измерения велись по отношению к культуральной жидкости.

Количество антигена грибов *C. albicans*, выделенного в среду во время роста грибов определяли следующим способом. Надосадочную жидкость состоящую из питательной среды после центрифугирования осаждали тремя объемами охлажденного спирта высшей очистки в течение суток при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ с дальнейшим центрифугированием ($3000g \times 10 \text{ мин}$) в течение 10 мин. Осадок высушивали и разводили 5 мл стерильной дистиллированной воды, затем определяли количество антигена. Опыты проводили в трех биологических повторностях.

Определение концентрации антигена *C. albicans*

Определение количества антигена (Аг) проводили с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора [Медянцев с соавт., 1999], в состав биочувствительной части которого входят антитела к антигену *C. albicans* и фермент бутирилхолинэстераза. Измеряли высоту катодного пика при потенциале -0.55 В , относящегося к процессу обратимого восстановления меркаптида ртути, образующегося в результате взаимодействия продукта спонтанного гидролиза тиола с материалом электрода (ртутью).

Высота тока пика зависит от концентрации продукта ферментативного гидролиза БТХИ, а отношение тока эксперимента к току контрольного (холостого) опыта пропорционально логарифму концентрации антигена. Строили градуировочную зависимость, которую использовали для определения неизвестной концентрации антигена.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с использованием компьютерных программ «Microsoft Excel» и «Statistic for Windows». При обработке результатов исследования вычисляли значение средней величины и стандартную ошибку средней. Достоверность различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Разброс показателей, отображенный в графиках, представлен с доверительным интервалом для $p \leq 0,05$. Исследование взаимосвязи между отдельными показателями проводили с применением корреляционного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка модели адгезии *C.albicans* на нитроцеллюлозной пленке.

Первым этапом исследований явилось создание модели для определения свойств адгезии *in vitro*, которая бы позволила адекватно изучить адгезивную способность штамма.

Первоначально было изучено взаимодействие клеток *C.albicans* с нитроцеллюлозной пленкой. Изучение связывания клеток гриба на нитроцеллюлозную пленку, приготовленную с добавлением глутарового альдегида в отсутствие белков в реакционной смеси, показало, что начальная оптическая плотность суспензии клеток после инкубации пленки практически не изменялась, отклонения были незначительны и составляли менее 0,03%. Микроскопические исследования показали наличие на пленке одиночных дрожжевых клеток.

Таким образом, показано, что сама нитроцеллюлозная пленка не обладает способностью связывать клетки гриба. Взаимодействие клеток с поверхностью пленки незначительно и носит неспецифический характер. Поэтому в дальнейших опытах на нитроцеллюлозной пленке с иммобилизованными белками неспецифическое связывание не учитывали.

Для изучения специфического связывания использовались белки макроорганизма: человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, иммуноглобулин А, гемоглобин и коллаген.

При специфическом связывании всех изучаемых белков при совместной иммобилизации их с глутаровым альдегидом внутри пленки, после инкубации на поверхности пленки адгезировались около 10% клеток патогенного штамма и около 0,2% клеток непатогенного штамма. Можно предположить, что клетки *C.albicans* не могут проникнуть внутрь пленки, а количество белка на поверхности недостаточно для адгезии клеток гриба.

В связи с этим, в последующих экспериментах использовали нитроцеллюлозную пленку с поверхностно иммобилизованными белками. Изучена адгезия клеток гриба к различным белкам (табл. 2), для оценки эффективности связывания и выбора наилучшего субстрата адгезии.

Полученные данные показывают, что поверхностное нанесение белков, позволяет добиться существенного увеличения адгезии клеток на нитроцеллюлозную пленку. По-видимому, поверхностная иммобилизация белка с помощью глутарового альдегида делает его более доступным для связывания с адгезинами *C. albicans*. Установлено, что максимальная адгезия (59.4%) наблюдалась на пленке с иммобилизованным гемоглобином, что значительно превышает соответствующие значения, полученные для ЧСА, БСА, иммуноглобулина А, коллагена. Полученные данные согласуются с данными литературы о способности гемоглобина усиливать процесс адгезии гриба [Chaffin *et al.*, 1998, Dostal *et al.*, 2003], раскрывая все адгезивные способности клетки гриба.

Поэтому для дальнейших исследований адгезии клеток мы использовали нитроцеллюлозную пленку с иммобилизованным гемоглобином, так как он, являясь основным компонентом клеток крови – эритроцитов, вполне доступен и сравнительно недорог.

Таблица 2.

Адгезия клеток гриба при различной иммобилизации белков (n=5; p<0.95)

Субстрат адгезии	Количество адгезированных клеток патогенного штамма, %	Количество адгезированных клеток непатогенного штамма, %
<i>Нитроцеллюлозная пленка</i>	0.03±0.1	0.01±0.1
<i>Белок при совместной иммобилизации</i>	10±0.1	0.2±0.1
<i>Белок, иммобилизованный на поверхность пленки:</i>		
• Человеческий сывороточный альбумин	28.0±0.4	0.5±0.2
• Бычий сывороточный альбумин	33.9±0.8	0.7±0.5
• Гемоглобин	59.9±0.7	1.4±0.4
• Иммуноглобулин А	23.4±0.8	0.5±0.2
• Коллаген	35.7±0.3	0.7±0.4

Вместе с этим осуществлялся подбор оптимальных условий для проведения процесса адгезии (рисунки 1-6). Изучено влияние возраста штамма на адгезию клеток, влияние на адгезию температуры инкубации пленок, времени инкубации, влияние состава среды инкубации и среды культивирования на процесс адгезии. При наблюдении 1-4 суточных культуры штаммов №4 и №228 установлено, что наибольший процент адгезировавшихся клеток у обоих штаммов приходится на 48-часовую культуру, хотя патогенный штамм №228 проявлял свою активность, как в первые, так и на третьи сутки. Отмечено, что *C.albicans* достигает начала стационарной фазы в течение 48 часов, при этом все биохимические процессы достигают своего пика. Однако, после двух суток роста, культура, особенно малоактивная, начинает стареть.

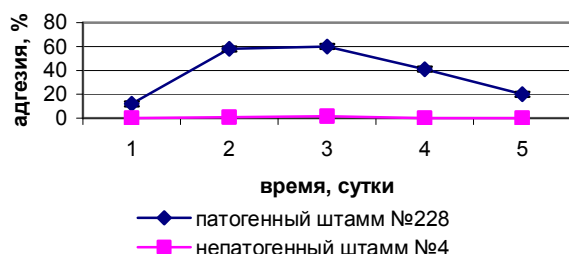


Рисунок 1. Влияние возраста штамма на адгезию клеток (n=5; p<0,95)

Так же выявлена зависимость интенсивности адгезии от температуры. Самые высокие значения адгезии получены у патогенного штамма №228 при 37⁰С. Однако для дальнейших исследований выбрана температура 30⁰С, которая является оптимальной для всех видов штаммов (патогенных и

непатогенных), а адгезия в этом случае идет также эффективно и составляет до 80% от максимальных значений.

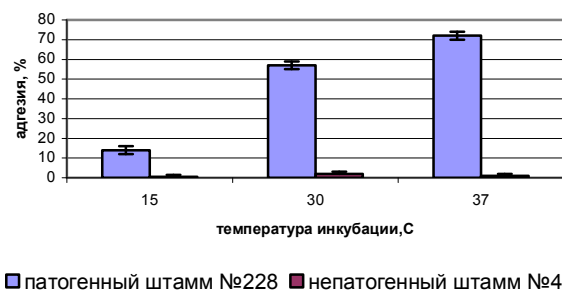


Рисунок 2. Влияние температуры инкубации на эффективность адгезии клеток ($n=5$; $p<0,95$)

Увеличение времени инкубации приводит к увеличению процента адгезированных клеток. Однако после 2 часов инкубации при микроскопических исследованиях наблюдалось деление клеток и образование трубок прорастания. То есть процент адгезировавшихся клеток увеличивался за счет образования новых клеток принявших активное участие в процессе адгезии. В связи с этим для анализа первоначальной культуры инкубацию необходимо проводить не позднее двух часов. Такой период инкубации позволяет разработать методику экспресс-определения адгезивных свойств штамма на основе предлагаемой модели.

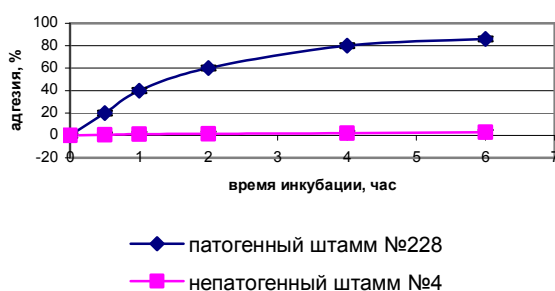


Рисунок 3. Влияние времени инкубации на адгезию клеток ($n=5$; $p<0,95$)

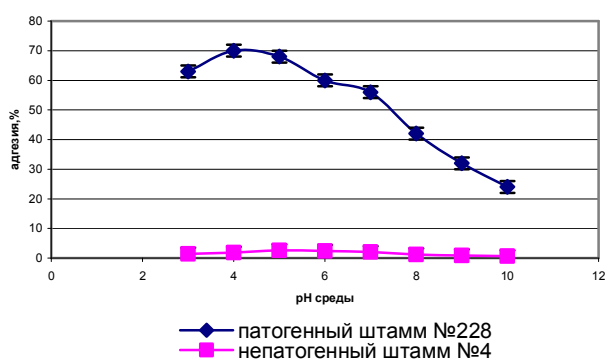


Рисунок 4. Влияние рН среды на процесс адгезии ($n=5$; $p<0,95$)

При подборе рН среды для инкубации, клетки суспендировали в буферном растворе с рН от 2 до 9 и инкубировали в течение двух часов. Исследование при более кислом рН не имеет смысла, так как происходит свертывание белков. Установлено, что наибольший процент адгезии отмечался при рН 2-5. Однако, слишком низкий рН среды нехарактерен для человеческого организма. Также учитывая, что максимальная

протеолитическая активность выявлена при слабо кислом pH среды [Klotz *et al.*, 1991] и она является наиболее благоприятной для жизнедеятельности гриба *C.albicans*, использовался буферный раствор с pH 5-5.5.

Важным фактором для проведения процесса адгезии является состав среды при инкубации суспензии клеток в присутствии нитроцеллюлозной пленки с иммобилизованным гемоглобином. Использование питательных сред, в качестве инкубационной среды, уменьшало адгезивные свойства грибов в 4-5 раз по сравнению с фосфатным буфером и физиологическим раствором. По-видимому, высокое содержание питательных веществ, в средах, дает грибу возможность, к активному питанию не прибегая к процессу адгезии. Применение фосфатного буфера стабилизирует биохимические процессы клеточной стенки гриба. В связи с этим, использование фосфатного буфера для проведения процесса адгезии наиболее целесообразно.

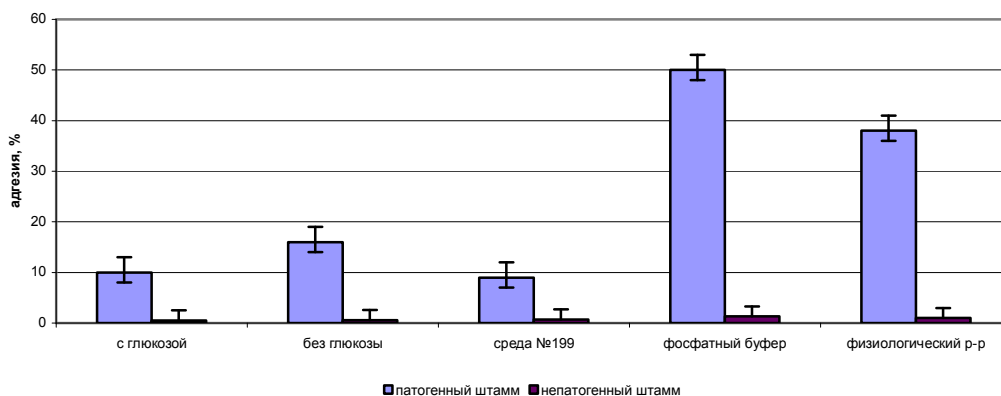


Рисунок 5. Влияние состава среды инкубации на процесс адгезии (n=5; p<0,95)

Метаболизм гриба при росте *in vivo* значительно отличается от культивирования в лабораторных условиях. Поэтому нами были проведено изучение адгезии на питательных средах различного состава. Для исследования влияние состава среды на адгезивные свойства штаммов были взяты среды: Ричарда, Крабиля, желточная среда, среда с галактозой, Сабуро, Сабуро в отсутствии глюкозы и модифицированная нами среда Сабуро с добавлением небольшого количества (4 г) тиогликолевой среды. Каждая среда содержала в составе свой, отличный от других, источник питательных веществ (например, крахмал, минеральные соли, белок, сахара, лецитин и другие питательные компоненты). Изучение культуры гриба на адгезивные свойства проводили после наступления равномерного роста. Причем продолжительность лаг-фазы зависела от качества среды. Так на среде Ричарда (минеральная среда) лаг-фаза продолжалась четверо суток, а на среде Сабуро без добавления глюкозы двое с половиной суток. Установление лаг-фазы производили методом отбора проб. Наибольший процент адгезии отмечался у штаммов, культивируемых на средах с углеводами (Крабиля, среда с галактозой, Сабуро и модифицированная среда Сабуро). Самый высокий процент адгезии наблюдался у штаммов, культивируемых на среде с галактозой и модифицированной среде Сабуро до 44% у патогенного штамма

и 2.5% у непатогенного штамма № 4. Самый низкий процент адгезии отмечался у штаммов, выращенных на среде Ричарда: 8.1% у патогенного штамма и 0.02% у непатогенного штамма. В результате проведенных экспериментов установили, что состав питательной среды не только определяет особенности метаболизма клеток гриба как описано в литературе, но и значительно изменяет скорость образования и характер адгезинов штаммов. Для дальнейшей работы использовалась модифицированная среда Сабуро, где за основу взята среда Сабуро, общепризнанно являющаяся оптимальной для культивирования грибов, с добавлением тиогликолевого компонента, что делает ее более богатой, стимулируя проявление широкого спектра адгезинов.

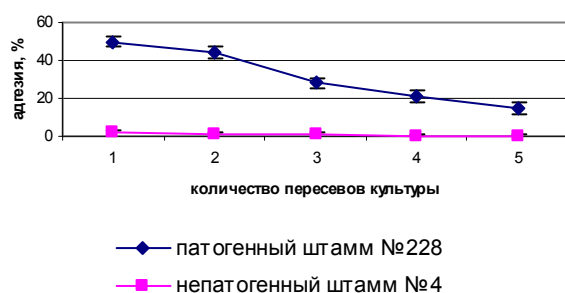


Рисунок 6. Влияние количества проведенных пассажей на адгезивные свойства штаммов ($n=5$; $p<0.95$)

Опытным путем доказано, что адгезивные свойства штаммов *C. albicans* меняются при проведении более двух пассажей на искусственной среде. Так, непатогенный штамм №4 терял свою способность к адгезии после третьего пассажа, а патогенный штамм №228 проявлял свою активность, хотя и в меньшей степени, после четвертого пассажа. Видимо, это связано с тем, что клеткам гриба, растущим на богатой среде, для жизнедеятельности достаточно питательных веществ, и образование большого количества адгезинов становится ненужным.

Таким образом, подобраны оптимальные условия для проведения процесса адгезии 48 часовой культуры *C. albicans* на гемоглобин, иммобилизованный на поверхности нитроцеллюлозной пленки. Время инкубации пленки составило 2 часа, а температура инкубации – 30°C .

2. Тестирование модели адгезии клиническими штаммами *C. albicans*, выделенными из различных мест локализации.

Для подтверждения адекватности разработанной модели адгезивные свойства штаммов *C. albicans* из различных мест локализации (ротовая полость и кожный покров) дополнительно изучали на различных белках, эти данные представлены в таблице 3.

Полученные данные показывают, что, независимо от места локализации, наилучшая адгезия у всех штаммов наблюдалась на пленке с иммобилизованным гемоглобином, что значительно выше, чем для ЧСА, БСА, Ig A, коллагена. Таким образом, модель с иммобилизованным гемоглобином наилучшим образом отображает адгезивные свойства штаммов. Установлено, что штаммы, выделенные с кожных покровов, значительно (почти в 2-3 раза) уступали в адгезии штаммам, выделенным из

ротовой полости. Таким образом, подтверждается предположение, что штаммы различной локализации обладают отличиями в адгезивных свойствах.

Таблица 3.

Уровень адгезии штаммов гриба к различным белкам при их поверхностной иммобилизации (n=5; p<0.95)

Штаммы	Человеческий сывороточный альбумин	Бычий сывороточный альбумин	Гемоглобин	IgA	Коллаген
Адгезия клинически значимых штаммов ротовой полости, % (N=12)	21.0±0.1	26.2±0.6	39.7±0.8	18.5±0.5	28.2±0.4
Адгезия клинически незначимых штаммов ротовой полости, % (N=7)	7.0±0.3	7.9±0.2	16.2±0.2	6.4±0.2	6.9±0.3
Адгезия клинически значимых штаммов кожных покровов, % (N=14)	12.1±0.2	13.4±0.4	16.1±0.4	10.3±0.5	14.4±0.6
Адгезия клинически незначимых штаммов кожных покровов, % (N=5)	3.1±0.4	2.9±0.7	4.8±0.6	2.4±0.4	3.9±0.7

Тестирование адгезивных свойств клинически значимых штаммов грибов показало, значительное (почти в 3 раза) увеличение уровня адгезии, по сравнению с клинически незначимыми штаммами. Из полученных данных видно, что наблюдаются статистически достоверные отличия у штаммов. Следует отметить, что разработанная модель достоверно отражает отличие адгезивных свойств штаммов грибов, являющихся возбудителями кандидоза, и штаммов, выделенных от лиц без клинического проявления кандидоза (кандиданосительство).

3. Изучение влияния трипсина и маннопротеидного антигена на адгезию клеток.

Известно, что в процессе адгезии клеток гриба участвуют различные компоненты клеточной стенки гриба, причем основными медиаторами адгезии являются белки и маннопротеины клеточной стенки, тогда как другие компоненты клеточных стенок, такие как хитин, β-глюкан и липиды принимают незначительное участие в способности гриба к адгезии [Сергеев с соавт., 2001].

Нами было изучено влияние трипсина и маннопротеидного антигена на белковые и маннопротеидные компоненты клеточной стенки *C. albicans*, для определения характера взаимодействия клетки гриба с предлагаемой

моделью. Существующие сведения о полном ингибировании процесса адгезии протеолитическими ферментами не нашли своего подтверждения в нашем исследовании. После обработки клеток гриба трипсином процент адгезии снизился, по сравнению с контролем, в два раза, но полностью адгезивных свойств клетки гриба не лишились (рисунок 7).

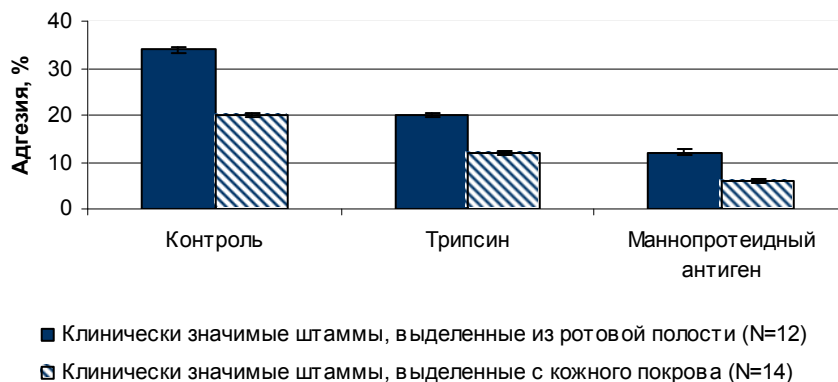


Рисунок 7. Влияние трипсина и маннопротеидного антигена на уровень адгезии клеток *C. albicans* (n=5; p<0.95)

Нанесение на пленку с иммобилизованным гемоглобином маннопротеидного антигена способствовало блокированию маннопротеидных компонентов клеточной стенки *C. albicans* - предполагаемых механизмов связывания клеток гриба с белковыми молекулами гемоглобина. Наблюдаемое снижение адгезии в два раза свидетельствует о значительной роли маннопротеинов в адгезии клеток гриба в данной системе.

Проведенные исследования продемонстрировали, что адгезия клетки гриба на пленку с иммобилизованным гемоглобином в значительной степени связана с белками и маннопротеинами клеточной стенки. Однако сохранение некоторой доли адгезивных способностей в процессе исследования, свидетельствует о наличии иных механизмов адгезии, возможно, связанных с гидрофобными свойствами поверхности клеточной стенки гриба.

Таким образом, адгезия гриба в данной модели протекает при участии разнообразных механизмов связывания клеточной стенки, что наиболее полно отражает возможности клетки в проявлении адгезивной способности.

4. Использование модели на основе нитроцеллюлозной пленки с иммобилизованным гемоглобином для изучения адгезивных свойств штаммов *Candida albicans* при кандидозах различной локализации.

Для изучения адгезивных свойств, все штаммы были разделены с учетом места обнаружения на три группы: 1) штаммы со слизистых оболочек ротовой полости, 2) штаммы со слизистых оболочек влагалища и 3) выделенные с поверхности гладкой кожи туловища и конечностей.

Кандидоз кожи обычно рассматривается как состояние, развивающееся вторично под действием общих факторов. Основным в патогенезе является нарушение барьерной функции кожи. Кроме этого

лечение антибиотиками провоцирует рост популяции *C. albicans* делающее возможным последующую колонизацию кожи.

Выделено 90 штаммов *C. albicans* от больных в возрасте от 10 до 54 лет с клинически подтвержденным диагнозом с яркой картиной поражения кожного покрова с высокой и низкой степенью обсемененности. Причем, у многих больных в возрасте от 32 до 54 лет встречались хронические формы кандидоза (ХКК) и микоза кожи (ХМК).

У штаммов *C. albicans*, выделенных от больных с диагнозом микоз и кандидоз кожи во всех группах прослеживается устойчивая закономерность в адгезивных способностях (таблица 4). Так, при высокой степени обсемененности в посевах уровень адгезии в 90% случаях был высоким или умеренно высоким, а при низкой степени обсемененности в 80% случаях низкий уровень адгезии.

Таблица 4.

Адгезивные свойства штаммов, выделенных с кожных покровов больных с клинически подтвержденным диагнозом микоз и кандидоз кожи различных возрастных групп (n=5; p<0.95)

Уровень обсемененности грибов <i>C.albicans</i>	Возрастные группы больных	Общее количество штаммов	Количество штаммов при различном уровне адгезии		
			<5%	5-12%	12-20%
КОЕ>10 ³ ед/мл	от 10 до 17 лет	15	1	4	10
	от 17 до 32 лет	15	2	4	8
	от 32 до 54 лет	15	2	7	6
КОЕ<10 ² ед/мл	от 10 до 17 лет	15	12	3	0
	от 17 до 32 лет	15	9	5	1
	от 32 до 54 лет	15	10	5	0

Таким образом, адгезивные способности штаммов, выделенных с поверхности кожи при кандидозах, коррелируют с клиническими проявлениями заболевания и уровнем обсемененности грибами *C. albicans*.

Однако, проведенное исследование адгезивных свойств штаммов *C. albicans* выделенных от больных с диагнозом «атопический дерматит» (АД) (130 штаммов) показало, что, в зависимости от возраста пациента, взаимосвязь обсемененности с уровнем адгезии проявляется различным образом (табл. 5). Так, для детей до 2 лет часто даже при очень высокой обсемененности (КОЕ>10⁵ ед/мл) штаммы характеризовались невысоким уровнем адгезии (<5%), тогда как для возрастных групп от 12-17 и 17-30 лет наибольшее число штаммов с низким уровнем адгезии соответствовало низкой степени обсемененности анатомической точки, а штаммам с высоким уровнем адгезии соответствовало высокая степень обсемененности.

Полученные результаты (уровень адгезии <5%) указывают, что у детей младшего возраста, и в некоторых случаях старшей группы больных АД, дрожжевая инфекция, по-видимому, чаще всего протекает в форме

неинвазивного процесса и является следствием основного заболевания. Однако в старшей группе больных часто выделялись штаммы с высоким уровнем адгезии, что указывает на более выраженные патогенные свойства штамма и его возможно более активную роль в инфекционном процессе. Такие проявления адгезивной способности штаммов свидетельствуют об патогенетических особенностях заболевания АД.

Таблица 5.

Адгезивные свойства штаммов, выделенных с кожных покровов больных с диагнозом «атопический дерматит» различных возрастных групп (n=5; p<0.95)

Уровень обсемененности грибов <i>C.albicans</i>	Возрастные группы больных	Общее количество штаммов	Количество штаммов при различном уровне адгезии		
			<5%	5-12%	12-20%
КОЕ>10 ⁴ ед/мл	дети до 2-х лет	18	12	4	2
	от 3 до 12 лет	25	6	13	6
	от 12 до 17 лет	20	3	7	10
	от 17 до 30 лет	17	2	4	11
КОЕ<10 ² ед/мл	дети до 2-х лет	6	4	1	1
	от 3 до 12 лет	15	9	4	2
	от 12 до 17 лет	12	8	3	1
	от 17 до 30 лет	17	11	4	2

Сопоставление, полученных результатов для штаммов, выделенных при АД и микозах кожи, требует учета патогенетических особенностей этих заболеваний. Поскольку в случае АД при имеющихся повреждениях кожного покрова симптомы кандидоза могут быть обусловлены менее агрессивными штаммами, тогда как при развитии ХКК инвазивный процесс связан со штаммами с высоким адгезивным потенциалом.

В кандидозе ротовой полости существенную роль играют патогенные факторы грибов *C. albicans*. Для *C. albicans* полость рта представляет собой очень благоприятную среду, кислая среда обеспечивает существование, а при недостатке углеводов – и быстрое размножение в дрожжевой фазе.

Для изучения адгезивных свойств были отобраны 90 штаммов, выделенных от больных с диагнозом «фарингомикоз» четырех основных возрастных групп.

Анализ полученных результатов показал (табл. 6), что при высокой степени обсемененности *C. albicans* в посевах во всех группах больных отмечался умеренно высокий или высокий уровень адгезии штаммов (от 15 до 50 %).

В группе с низкой степенью обсемененности *C.albicans* у больных от 3 до 12 лет и от 12 до 17 лет уровень адгезии штаммов в 70% случаев не превышал 15%. В то же время для групп 17-32 лет и 32-56 лет преимущественно отмечался умеренно высокий и высокий уровень адгезии штаммов (от 15 до 50 %). Максимальную адгезивную способность проявляли

штаммы, выделенные от больных при острых заболеваниях.

Таблица 6.

Адгезивные свойства штаммов, выделенных из ротовой полости у больных с диагнозом «фарингомикоз» (n=5; p<0.95)

Уровень обсемененности грибов <i>C.albicans</i>	Возрастные группы больных	Общее количество штаммов	Количество штаммов при различном уровне адгезии		
			<15%	15-30%	30-50%
КОЕ>10 ⁴ ед/мл	от 3 до 12 лет	17	2	9	6
	от 12 до 17 лет	10	1	4	5
	от 17 до 32 лет	16	1	8	7
	от 32 до 56 лет	19	0	9	10
КОЕ<10 ² ед/мл	от 3 до 12 лет	10	7	3	0
	от 12 до 17 лет	6	4	2	0
	от 17 до 32 лет	10	2	7	1
	от 32 до 56 лет	10	0	8	2

Низкий уровень адгезии (менее 5 %) и небольшое число клеток, выделенных при посеве, в ряде случаев позволили трактовать наличие гриба как кандиданосительство или контаминацию.

Характерной особенностью вагинального кандидоза является то, что грибы *C.albicans* входят в состав нормальной микрофлоры влагалища у женщин. Свойства *C.albicans* (адгезия, прорастание, рост, инвазия и т.д.) обуславливают патогенез вагинального кандидоза.

Изучены адгезивные способности 33 штаммов *C.albicans*, выделенных у женщин репродуктивного возраста с диагнозом «кандидоз влагалища». Результаты исследования адгезивных свойств штаммов, выделенных у женщин репродуктивного возраста с диагнозом «кандидоз влагалища» (рисунок 8) показали, что наибольшее количество штаммов проявляли высокую адгезивную способность при значительной степени обсемененности (КОЕ>10⁵ед/мл). В то же время, даже при низкой обсемененности некоторое количество штаммов характеризовались высоким уровнем адгезии, что может указывать на высокую вероятность развития инфекции при благоприятных для этого условиях.

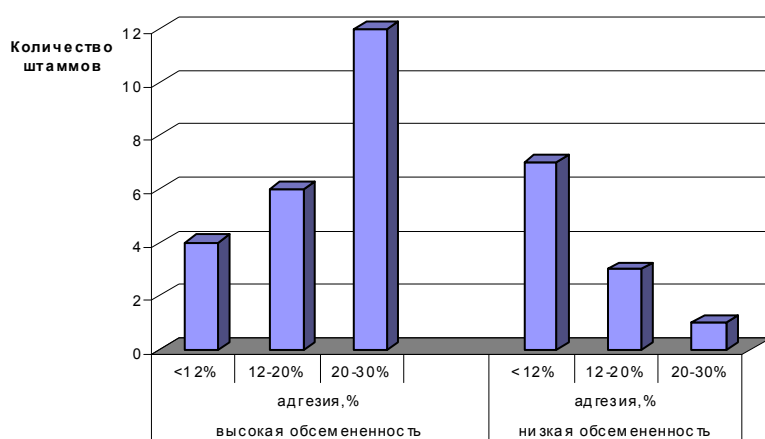


Рисунок 8. Адгезивные свойства штаммов, выделенных у женщин репродуктивного возраста с диагнозом «кандидоз влагалища» (n=5; p<0.95)

Таким образом, углубленное исследование адгезии показало, что адгезивные способности штаммов непосредственно связаны с местом локализации микоза. Установлено, что наиболее выраженные адгезивные свойства отмечались у штаммов, выделенных с поверхностей слизистых оболочек, как ротовой полости, так и влагалища, в то время как штаммы, выделенные с кожи и ее придатков, существенно (в 1.5-3 раза) уступают им. При этом уровень адгезии изолятов *C.albicans*, обнаруженных на слизистых оболочках ротовой полости, достигает 47%, тогда как штаммы, обнаруженные у больных с диагнозами “кандидоз влагалища” имели уровень адгезии от 18 до 31%.

Отличия в развитии кандидоза и как следствие – штаммовые различия в данных анатомических локусах можно объяснить уровнем pH, естественным микробным окружением и факторами местного иммунитета, а также способом питания гриба и доступностью питательных веществ.

5. Адгезивные свойства клинически незначимых штаммов *C. albicans* различной локализации

Известно, что при кандиданосительстве могут встречаться как непатогенные, так и патогенные штаммы. Также грибы *C. albicans* в небольшом количестве могут встречаться при посевах после проведенной успешно антифунгальной терапии. В связи с этим, представляет интерес изучить адгезию, один из основных факторов патогенности, у клинически незначимых штаммов.

Исследование штаммов *C. albicans*, выделенных от больных после успешно проведенной терапии, показало снижение уровня адгезии в 2-3 раза, вне зависимости от места локализации инфекции (табл. 7).

Таблица 7.

Адгезивные свойства штаммов *C.albicans*, выделенных от больных после успешно проведенной терапии.

Локализация штаммов	Среднее количество <i>C.albicans</i> , КОЕ/мл		Средний уровень адгезии, %	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Ротовая полость, n=24	$(4.2 \pm 0.5) \times 10^4$	$(2.8 \pm 0.2) \times 10^2$	53.1 ± 3.4	13.2 ± 1.2
Влагалище, n=11	$(5.8 \pm 0.6) \times 10^5$	$(1.4 \pm 0.6) \times 10^2$	23.3 ± 1.6	10.7 ± 1.1
Кожный покров, N=16	$(2.6 \pm 0.1) \times 10^3$	менее 10^2	14.8 ± 1.3	6.1 ± 0.6

Характер выявленных изменений хорошо согласуется с клиническими проявлениями заболевания и культуральными исследованиями. У больных в фазе ремиссии представительство дрожжевых грибов *C.albicans* в составе микрофлоры значительно снижается, приближаясь к количеству менее 10^2 КОЕ/мл что характерно для нормофлоры. При этом происходит снижение уровня адгезии штаммов после лечения до уровня клинически незначимых штаммов (рисунок 9). Можно предположить, что проведенная терапия, затрагивая основные жизненные функции грибковой клетки, нарушает при этом процесс синтеза адгезинов, кроме того, возможно, после проведения лечения происходит замещение штаммов на менее патогенные.

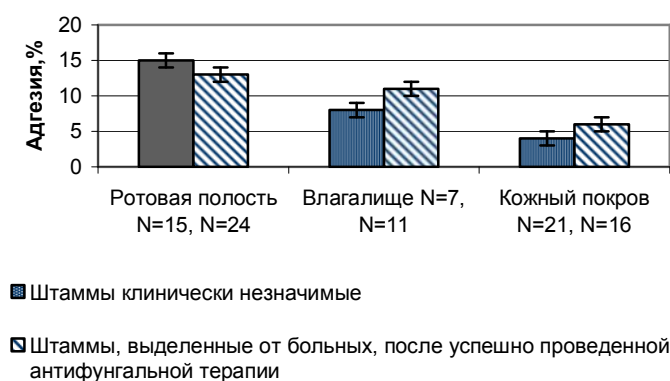


Рисунок 9. Адгезия клинически незначимых штаммов, и штаммов, выделенных от больных после успешно проведенной терапии. (n=5, p<0.05)

Тестирование адгезивных свойств клинически незначимых штаммов грибов показало, что различия между ними, в зависимости от их локализации в организме выражены в меньшей мере, по сравнению с клинически значимыми штаммами (рисунок 10). Основная группа клинически незначимых штаммов обладает адгезивной активностью от 2 до 10%, при этом для кожных штаммов характерны более низкие, чем для штаммов, выделенных со слизистой, значения адгезии, что подтверждает наши предположения, относительно влияния среды обитания на адгезивные свойства гриба.

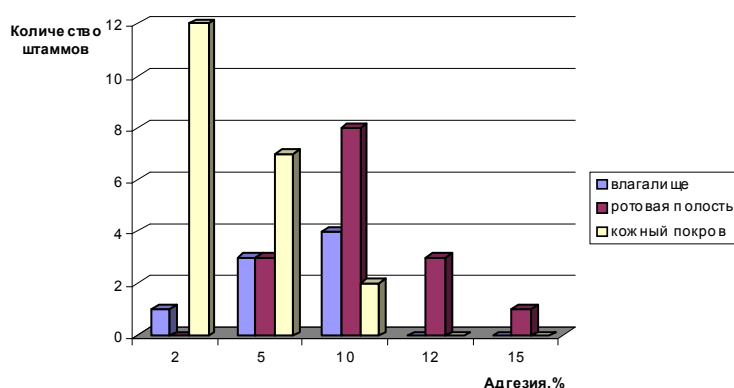


Рисунок 10. Адгезивные свойства клинически незначимых штаммов. (n=5; p<0.95)

Таким образом, определение адгезивных свойств штамма позволяет установить этиологическую роль гриба в данном заболевании, то есть, выяснить, является он возбудителем заболевания или комменсалом. В случае обнаружения при заболевании нескольких потенциальных возбудителей, как

бактериальной, так и грибковой природы, уровень адгезии штамма гриба позволяет охарактеризовать его патогенность и выбрать правильный подход к лечению данного заболевания.

6. Сопоставление адгезивных и антигенных свойств клинических штаммов - основных факторов патогенности *C.albicans*

Важным дополнением для подтверждения патогенности штамма является изучение взаимосвязи основных факторов патогенности грибов (адгезии и уровня антигенов) у различных клинических штаммов *C. albicans*. Антигены *C.albicans* принимают активное участие в формировании иммунного ответа и не несут специфической роли рецепторов и факторов адгезии.

Различие адгезивных способностей штаммов, выделенных со слизистой и с кожи, позволяет предположить различный механизм экспрессии факторов патогенности, в частности, адгезинов и антигенов. Поэтому, в ходе дальнейших исследований определяли количество антигена, выделяемого штаммами двух основных групп (кожные покровы и ротовая полость). Исследовано 48 штаммов *C.albicans* различной локализации, в том числе, 21 с кожного покрова и 27 - из ротовой полости.

Таблица 8

Содержание антигена в клетках и культуральной жидкости после роста штаммов *C. albicans* различной локализации

Локализация штамма	Средняя концентрация антигена	
	В клетках <i>C. albicans</i> , мг/мл	Выделенного в среду клетками <i>C. albicans</i> , мг/мл
Ротовая полость, n=27	$106,15 \times 10^{-10}$	$0,19 \times 10^{-3}$
Кожный покров, n=21	$55,7 \times 10^{-10}$	100×10^{-3}

Установлено, что для штаммов, выделенных из ротовой полости, характерно повышенное содержание антигена в клетках, по сравнению со штаммами, выделенными с кожи (средние значения штаммов с высокой степенью адгезии 120×10^{-10} и $45,7 \times 10^{-10}$ мг/мл соответственно). В то же время, кожные штаммы выделяют значительно большее количество Аг в среду, по сравнению со штаммами, выделенными из зева (85×10^{-3} и $0,2 \times 10^{-3}$ мг/мл соответственно) (табл.8). Непатогенный штамм №4 также выделял большее количество Аг в среду, чем содержал его в клетке ($5,75 \times 10^{-3} \pm 0,55$ и $0,99 \times 10^{-10} \pm 0,1$).

Полученные результаты выявили взаимосвязь между количеством антигена и уровнем адгезии штамма *C. albicans*. Штаммы с высоким уровнем адгезии содержат и выделяют в среду количество антигена в 30 раз большее, по сравнению со штаммами с низким уровнем адгезии. При этом для штаммов, выделенных с кожных поверхностей, уровень адгезии коррелирует с концентрацией антигена в среде и в клетках, тогда как для штаммов

выделенных из ротовой полости повышение уровня адгезии сопровождается в основном увеличением концентрации Аг в клетках (табл.9).

Таблица 9.

Содержание антигена в клетках и культуральной жидкости после роста штаммов *C. albicans* в зависимости от их адгезивной способности

Уровень адгезии штаммов <i>C. albicans</i>	Средняя концентрация антигена	
	В клетках <i>C. albicans</i> , мг/мл	Выделенного в среду клетками <i>C. albicans</i> , мг/мл
Высокий, n=18	$115,7 \times 10^{-10}$	$100,0 \times 10^{-3}$
Низкий, n=17	$0,99 \times 10^{-10}$	$5,75 \times 10^{-3}$

Таким образом, изучение адгезии как основного фактора патогенности, позволило показать наличие выраженных адгезивных свойств у штаммов, способных вызывать кандидозную инфекцию. Штаммы с высоким уровнем адгезии выявлялись даже среди штаммов-комменсалов, что свидетельствует о возможности их перехода под воздействием определенных экзогенных, эндогенных факторов в возбудителей заболевания. Использование для изучения адгезивных способностей штаммов *C. albicans* разработанной модели на основе нитроцеллюлозной пленки с иммобилизованным гемоглобином впервые позволило провести систематическое исследование клинических штаммов.

Кроме того, была выявлена корреляция между различными характеристиками патогенных свойств гриба. Штаммы с высоким уровнем адгезии содержали и выделяли в среду большее количество антигена.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая модель для определения адгезивных свойств дрожжеподобных грибов.
2. Выявлены отличия в адгезивных свойствах клинических штаммов *C. albicans* различной локализации. Максимальные значения уровня адгезии штаммов, выделенных из трех основных точек локализации инфекции (ротовая полость, кожные покровы и слизистые влагалитца), составили: $54 \pm 0.5\%$; $28 \pm 0.2\%$ и $18 \pm 0.1\%$; минимальные - $14 \pm 0.1\%$; $7.4 \pm 0.2\%$ и $3.2 \pm 0.1\%$ соответственно.
3. Установлено, что адгезия клинически значимых штаммов *C. albicans* значительно (в 2.5-3 раза) превышает уровень адгезии штаммов, выделенных от практически здоровых лиц без признаков кандидоза (клинически незначимых или после лечения противогрибковыми препаратами).
4. Выявлена корреляция адгезивных и антигенных свойств клинических штаммов *C. albicans*. Отмечен различный характер распределения

антигена между клеткой гриба и средой, в зависимости от локализации штамма.

5. Предложены новые методологические подходы к практической оценке патогенного потенциала клинических штаммов *C. albicans*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Лисовская С.А.** Адгезия бластоспор гриба *Candida albicans* как критерий патогенности клинических штаммов /Н. И. Глушко //.- Инфекции и иммунитет, сборник статей, - Казань 2003. – С.54-56.
2. Глушко Н.И. Изучение чувствительности in vitro патогенных штаммов *Candida albicans* к системным антимикотикам /**С. А. Лисовская**, В. Р. Паршаков, Л. И. Бибаева// - Инфекции и иммунитет, сборник статей,- Казань, 2003.— С.52-54.
3. **Лисовская С.А.**, Глушко Н.И., Халдеева Е.В. Лабораторная модель для определения адгезивных свойств дрожжеподобных грибов.// Проблемы медицинской микологии.-2006.-Т.8, №3.-С.36-39.
4. **Лисовская С.А.** Адгезивные свойства штаммов *Candida albicans* при кандидозах различной локализации / Н. И. Глушко, Е. В. Халдеева// Проблемы медицинской микологии.-2007.-Т.9, №1.-С.26-29.
5. **Лисовская С.А.**, Патогенные свойства грибов рода *Candida* при инфекциях верхних дыхательных путей /Н. И. Глушко, Е. В. Халдеева// Практическая медицина, - Казань, 2007. - Т.23, №04.-С.38-39.
6. Н. И. Глушко Проблемы культуральной диагностики микозов в дерматологии /**С.А.Лисовская**.// Актуальные проблемы дерматовенерологии. XXI век. Материалы научно-практической конференции, Казань, 2003.-С.21-22.
7. **Лисовская С.А.** Усиление адгезивных свойств штаммов *C. albicans* при микст-инфекции с мицелиальными грибами /Н. И. Глушко, В. Р. Паршаков // Проблемы мед. микологии. Тез. Докл. 8 Кашкинских чтений.-2005.-Т.7, №2.-С.86.
8. Хаертдинова Л.А. Колонизация кожных покровов при atopическом дерматите у детей школьного возраста / Н. И. Глушко, **С. А. Лисовская** // Проблемы мед. микологии. Тез. Докл. 8 Кашкинских чтений.-2005.-Т.7, №2.-С.91.
9. Глушко Н.И. Устойчивость штаммов *Candida albicans* к флуконазолу и возможный путь ее возникновения / **С. А. Лисовская**, Е. В. Халдеева // Проблемы мед. микологии. Тез. Докл. 8 Кашкинских чтений. -2005.-Т.7, №2.-С.100.
10. Хаертдинова Л.А. Бактериальные и грибковые осложнения atopического дерматита / Н. И. Глушко, **С. А. Лисовская** // Тез. докл. IX Всеросс. Съезда дерматовенерологов. -Москва, 2005.- Т.1.- С.60.
11. Глушко Н.И. Грибковые ассоциации при онихомикозах / **С. А. Лисовская**, В. Р. Паршаков, Н. Ю. Низамова, Е. В.

- Файзуллина//Успехи медицинской микологии. Материалы четвертого всероссийского конгресса по медицинской микологии.- Т.VIII.- Москва, национальная Академия микологии, 2006. -С.25.
12. **Лисовская С.А.** Новые подходы в изучении адгезивных свойств патогенных штаммов *Candida albicans* / Н. И. Глушко // Проблемы медицинской микологии. Тез. Докл. 9 Кашкинских чтений, 2006.-Т.8, №2.-С.58.
 13. **Лисовская С.А.** Патогенные свойства штаммов грибов рода *Candida* в микробных ассоциациях при инфекциях слизистых оболочек зева / Н. И. Глушко, Е. В. Халдеева, Р. С. Фассахов// Проблемы мед. Микологии. Тез. Докл. 10 Кашкинских чтений.-2007.-Т.9, №2.-С.74.
 14. **Лисовская С.А.** Адгезивные свойства штаммов *Candida albicans* при кандидозах различной локализации / Н. И. Глушко, Е. В. Халдеева// Проблемы медицинской микологии. Тез. Докл. 10 Кашкинских чтений.-2007.-Т.9, №1.-С.26-29.
 15. **Лисовская С.А.** Влияние условий культивирования на адгезивную способность *Candida albicans* / Н. И. Глушко, Е. В. Халдеева// Успехи медицинской микологии. Материалы пятого всероссийского конгресса по медицинской микологии. - Т.9.-М.: Национальная академия микологии, 2007.-С.6.
 16. **Лисовская С.А.** Адгезия и резистентность штаммов *Candida albicans* как характеристики патогенности / Н. И. Глушко // Современная микология в России. Тез. Докл. 2 Съезда микологов России.-Москва, 2008.
 17. **Лисовская С.А.** Протеолитические свойства клинических штаммов *Candida albicans* / Н. И. Глушко, Е. В. Халдеева // Проблемы медицинской микологии. Тез. Докл. 11 Кашкинских чтений, 2008.-Т.10, №8.-С.60.